

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



09/242254



REC'D	11 OCT 1997
WIPO	PCT

**Bescheinigung**

**PRIORITY DOCUMENT**

Herr Professor Dr.med.Dr.h.c. Wolf-Georg F o r s s m a n n  
in Hannover/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der  
Bezeichnung

"Verfahren zur Gewinnung von Peptiden aus Kör-  
perflüssigkeiten und Geweben sowie Zellüber-  
ständen und zur Identifikation von krankheits-  
relevanten Peptidmarkern"

am 13. August 1996 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-  
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-  
bole C 07 K und G 01 N der Internationalen Patentklassifika-  
tion erhalten.

München, den 19. März 1997

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Joost

Aktenzeichen: 196 32 521.8



**NIEDERSÄCHSISCHES INSTITUT FÜR  
PEPTID-FORSCHUNG GmbH (IPF),  
Hannover  
im Medical Park**

Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung (GmbH, IPF),  
Feodor-Lynen-Str. 31 D-30625 Hannover, Federal Republic of Germany

*Direktor:*  
Prof. Dr. med. Wolf-Georg Forssmann  
Feodor-Lynen-Str. 31  
D - 30625 Hannover, FRG

*Abteilung I: Präparative Peptid-Chemie  
Dr. med. Peter Schulz-Knappe*

Telefon: (0511)-5455-160  
Telefax: (0511)-5466-101

Ihr Zeichen:

Ihre Nachricht vom:

Unser Zeichen:  
PatDPD

Datum:  
13. August 1996

**Patentanmeldung**

**Anmelder:**

Forssmann, Wolf-Georg, Prof. Dr. med., 30625 Hannover

**Erfinder:**

Forssmann, Wolf-Georg, Prof. Dr. med., 30625 Hannover

Schulz-Knappe, Peter, Dr. med., 30519 Hannover

Opitz, Hans-Georg, Dr. rer. nat., Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim

**Titel:**

Verfahren zur Gewinnung von Peptiden aus Körperflüssigkeiten und Geweben sowie Zellüberständen und zur Identifikation von krankheitsrelevanten Peptidmarkern.

**Abstrakt:**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, durch das Peptide mit einem Molekulargewicht kleiner als 40 kDa von Patienten mit einer beliebigen Erkrankung so separiert und quantitativ analysiert werden, daß nach Vergleich mit dem Peptidmuster von Probanden ohne diese Erkrankung krankheitsrelevante Markerpeptide identifiziert werden. Dabei wird nach einer Ultrafiltration des Ausgangsmaterials (Blutplasma,

13.08.96

Blutfiltrat, Urin, Liquor cerebrospinalis, Aszites, Lymphe, gastrointestinalen Sekreten, Kulturüberstand von Zellen (Primärzellkultur, etablierte Zelllinien), Gelenksflüssigkeit, Gewebsextrakt) eine Peptidextraktion mit nachfolgender chromatographischer Auftrennung und massenspektrometrischer Analyse durchgeführt.

Das Verfahren ist gekennzeichnet durch

1. Die Verwendung von Ultrafiltrat aus Körperflüssigkeiten und Gewebsextrakten
2. Die Gewinnung der Filtrat-Peptide und ihre Auftrennung in Fraktionen
3. Die Kartierung der Peptid-Fraktionen anhand von Retentionsverhalten und molekularer Masse
4. Die vergleichende Analyse mit den Daten einer Referenzmessung bei gesunden Probanden
5. Bestimmung von krankheitsspezifischen Peptidmarkern

#### Beschreibung

zu 1. Peptide werden nach einer dem Fachmann bekannten Ultrafiltration des entsprechenden Ausgangsmaterials im Filtrat gewonnen. Dabei werden Filter mit einer molekularen Ausschlußgröße verwendet, die zwischen 10 und 40 kDa liegt. Im Rahmen der Filtration werden zwischen 0.2 und 50 L Filtrat gewonnen, die sofort nach Abschluß der Filtration durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 bis 4 eingestellt werden.

zu 2. Die nach Ultrafiltration im Filtrat vorliegenden Peptide werden durch Adsorption an chromatographische Säulenmaterialien, insbesondere Kationenaustauscher (z.B. Fraktogel SP 650 M, Merck, Darmstadt; Source S, Pharmacia, Freiburg), Anionenaustauscher (Merck Fraktogel TMAE 650 M, Pharmacia Source Q) und Reverse Phase (Pharmacia Source 15 RPC, Reverse Phase C18, Vydac, Hesperia, USA) mit nachfolgender Elution im linearen Gradienten oder durch stufenweise Elution gewonnen. Die in dieser ersten Auftrennung gewonnenen Peptid-Fraktionen werden in einer zweiten chromatographischen Trennung vorzugsweise über Reverse Phase (Pharmacia Source RPC, Vydac C18) in Fraktionen aufgetrennt.

zu 3. Die Kartierung der Peptid-Fraktionen erfolgt durch massenspektrometrische Analyse mit MALDI-MS (Matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry) und ESI-MS (Electrospray ionization-MS), hierbei vorzugsweise mit

13.08.96

der on-line Kopplung einer microbore Reverse Phase Trennung und der Massenspektrometrie (LC-MS-Kopplung). Aus den erhaltenen Daten wird eine mehrdimensionale Tabelle nach Retentionsverhalten, Molekulargewicht und Signalintensität gebildet.

zu 4. Die über die Schritte 1-3 gewonnenen Daten von Patienten mit einer bekannten Grunderkrankung werden mit den gleichartig gewonnenen Daten einer gesunden Referenzpopulation verglichen. Hierbei werden sowohl qualitative Änderungen (z.B. das Auftreten neuer Peptide oder das Fehlen von Peptiden) als auch quantitative Änderungen (das vermehrte bzw. verminderte Auftreten von einzelnen Peptiden) festgestellt. Die über die vergleichende Analyse definierten „Targets“ werden im weiteren durch dem Fachmann bekannte Methoden peptidchemisch aufgereinigt und ihre Primärstruktur aufgeklärt.

zu 5. Die erhaltene Sequenzinformation wird mit Protein- und Nucleinsäuredatenbanken sowie nachfolgend mit Literaturdaten verglichen. Die Relevanz der dargestellten Peptide bezüglich der untersuchten Erkrankung wird überprüft z.B. durch funktionelle Studien und durch Reihenscreening an geeigneten Patientengruppen.

#### Beispiel 1:

Verwendung von Körperflüssigkeiten, hier: Blutfiltrat (Hämofiltrat, HF)

##### . Gewinnung von HF

HF wird im Rahmen einer arterio-venösen oder auch veno-venösen Hämofiltration nach dem Fachmann bekannten Techniken an ausgewählten Patienten oder Probanden durchgeführt. Die Gewinnung von HF erfolgt in der Weise, wie sie im Prinzip bei chronisch nierenkranken Patienten routinemäßig durchgeführt wird. Über einen arterielle Ableitung und venöse Zuleitung (arterio-venöse HF) oder eine venöse Ableitung mit venöser Zuleitung (veno-venöse HF) wird das Blut des Patienten unter apparativer Unterstützung durch ein Hämofiltrationsgerät (z.B. Hemoprozessor, Sartorius, Göttingen; AK 10 HFM, Gambro, Hechingen) über ein Hämofilter geleitet (z.B. Hemoflow F 60 oder Hemoflow HF 80 S, Fresenius, Bad Homburg; Hemoflow FH 77 H und Hemoflow HF 88 H, Gambro), das eine molekulare Ausschlußgröße von

13.08.96

bis zu 40 kDa besitzt. Das dem Patienten entzogene Filtratvolumen wird durch eine Elektrolytlösung substituiert (z.B. SH 01, SH 05, SH 22, SH 29, Schiwa, Glandorf). Im Rahmen des hier vorliegenden Verfahrens wird eine diagnostische Hämofiltration mit dem Ziel durchgeführt, zwischen 1 und 30 L HF bei einem Patienten innerhalb einer Hämofiltration zu gewinnen. Das Hämofiltrat wird zur Vermeidung der Proteolyse sofort mit verdünnter Säure (z.B. 1 M HCl) auf einen pH-Wert zwischen 2 und 4 eingestellt und auf 4° C gekühlt.

## 2. Gewinnung der HF-Peptide und Auftrennung in Fraktionen

### 2.1 Peptidextraktion mit stufenweiser Elution

10 L Hämofiltrat werden mit entionisiertem Wasser auf eine Leitfähigkeit von 6 mS/cm verdünnt und der pH mit Salzsäure auf 2.7 eingestellt. Das HF wird dann auf eine Chromatographiesäule aufgetragen. Nach Bindung der HF-Peptide werden die gebundenen Peptide mit einer pH-Stufenelution eluiert. Dabei werden 7 Puffer mit aufsteigendem pH verwendet.

#### *Chromatographiebedingungen:*

Fluß beim Auftrag: 100 ml/min

Fluß beim Eluieren: 30 ml/min

Detektion: 214, 280 nm

Säule: Vantage (Amicon, Witten) 6 cm Durchmesser x 7 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Fraktogel TSK SP 650 M (Merck, Darmstadt)

Anlage: BioCAD 250, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer	pH-Wert	Puffersubstanzen	Molarität
Elutionspuffer 1:	3.6	Zitronensäure	0.1
Elutionspuffer 2:	4.5	Essigsäure	0.1
Elutionspuffer 3:	5.0	Äpfelsäure	0.1
Elutionspuffer 4:	5.6	Bernsteinsäure	0.1
Elutionspuffer 5:	6.6	Natriumdihydrogenphosphat	0.1
Elutionspuffer 6:	7.4	Dinatriumhydrogenphosphat	0.1
Elutionspuffer 7:	9.0	Ammoniumcarbonat	0.1

Die Eluate 1-7 werden separat gesammelt.

13.08.96

## 2.2 Zweite chromatographische Auftrennung

Die Eluate 1-7 werden separat über eine Reverse-Phase-Säule chromatographiert.

### *Chromatographiebedingungen:*

Fluß beim Auftrag: 10 ml/min

Fluß beim Eluieren: 4 ml/min

Detektion: 214 nm

Säule: HPLC-Stahlsäule, 1 cm Durchmesser, 12.5 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Source RPC 15 µm (Pharmacia, Freiburg)

Anlage: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer A: 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 200 ml

Das Eluat wird in 4 ml-Fractionen gesammelt

## 3. Kartierung der Peptid-Fractionen

### 3.1 LC-MS-Messung der einzelnen Fractionen

Aliquots der in 2.2 gewonnenen Fractionen werden auf eine Microbore-Reverse Phase Säule aufgetragen und im Gradient eluiert. Die Detektion erfolgt mit UV-Detektor und on-line mit einem Elektrospray-Massenspektrometer

### *Chromatographiebedingungen:*

Fluß beim Auftrag: 20 µl/min

Fluß beim Eluieren: 20 µl/min

Detektion: 220 nm

Säule: C18 AQS, 3µm, 120 A, 1 mm Durchmesser, 10 cm Länge (YMC, Schermbeck)

Anlage: ABI 120 Dual solvent Delivery System

Puffer A: 0.06% Trifluoressigsäure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 90 min



13.08.96

*on-line Massenspektrometrie:*

API III mit Elektrospray-Interface (Perkin-Elmer, Weiterstadt)

Positive Ion Modus

Meßbereich:  $m/z$  von 300 bis 2390

Scan-Zeit: 7 sec

Scan-Fenster: 0.25  $m/z$ 

Datenerfassung erfolgt mit MacSpec oder MultiView Software (Perkin-Elmer).

## 3.2 MALDI-MS Messung der einzelnen Fraktionen

Aliquots der in 2.2 gewonnenen Fraktionen werden mit unterschiedlichen Matrixsubstanzen im MALDI-MS gemessen.

Aus den Rohdaten wird eine mehrdimensionale Tabelle erstellt unter Berücksichtigung der Scan-Nummer, Signalintensität und nach Kalkulation der Massen aus den multipel geladenen Ionen eines Scans

## 4. Vergleichende Analyse

## 4.1 Identifikation neuer, fehlender oder in ihrer Menge deutlich verschiedener Peptide

## 4.2 Peptidchemische Charakterisierung der identifizierten Targets

Aus dem gewonnenen Rohmaterial (z.B. Großpräparationen von Hämofiltrat) werden die identifizierten Targets in Mengen aufgereinigt, die eine Sequenzanalyse erlauben. Dazu werden die unterschiedlichen, dem Fachmann bekannten chromatographischen Trenntechniken (Reverse Phase, Ionenaustausch, Ausschlußgrößenchromatographie, Hydrophobe Interaktions-Chromatographie etc.), die im Allgemeinen zur Auftrennung von Peptidgemischen eingesetzt werden, verwendet. Nach jeder chromatographischen Trennung einer Fraktion werden über ESI-MS, MALDI-MS oder auch LC-MS die Targets erneut in den Fraktionen identifiziert. Dieses Procedere wird unter Variation der chromatographischen Parameter so oft wiederholt, bis ein reines Produkt der gesuchten Spezifikation, d.h. Retentionszeit und molekularer Masse, vorliegt. Darauf folgt die Bestimmung einer Teil- oder Komplet-Aminosäure-Sequenz. Im Anschluß wird ein Datenbankvergleich durchgeführt an den bekannten

13.08.96

Datenbanken (Swiss-Prot und EMBL-Peptid-und Nucleinsäure-Datenbank) mit dem Ziel der Identifikation der Teil- oder Kompletsequenz. Ist kein Datenbankeintrag vorhanden, erfolgt die Aufklärung der Primärstruktur

## Beispiel 2:

Verwendung von Körperflüssigkeiten, hier: Aszites

### 1. Gewinnung von Aszites

Aszites bildet sich als extravasales Exsudat bei unterschiedlichen Erkrankungen (maligne Tumoren, Leberstörungen etc.). Im Rahmen des hier vorliegenden Verfahrens werden zwischen 1 und 10 L Aszites durch Punktion gewonnen und danach zur Vermeidung der Proteolyse sofort mit verdünnter Säure (z.B. 1 M HCl) auf einen pH-Wert zwischen 2.0 und 4.0 eingestellt und auf 4° C gekühlt. Nach einer Ultrafiltration über eine Cellulose-Triacetat Membran mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa (Sartocon-Mini Apparatur, Sartorius) wird das Filtrat als Quelle von Peptiden im weiteren verwendet.

### 2. Gewinnung der Aszites-Peptide und Auftrennung in Fraktionen

#### 2.1 Peptidextraktion mit Gradienten-Elution

5 L Aszites-Filtrat werden auf pH 2.0 eingestellt und über einen präparative Reverse Phase Säule getrennt

*Chromatographiebedingungen:*

Fluß beim Auftrag: 40 ml/min

Fluß beim Eluieren: 40 ml/min

Detektion: 214 nm, 280 nm

Säule: Waters Kartuschensystem, 4,7 cm Durchmesser, 30 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Vydac RP-C18, 15-20µm

Anlage: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer A: 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 3000 ml

13.08.96

Das Eluat wird in 50 ml-Fractionen gesammelt

Der weitere Verlauf der Charakterisierung entspricht Beispiel 1.

### Beispiel 3:

Verwendung von Körperflüssigkeiten, hier: Urin

#### 1. Gewinnung von Urin

Urin wird direkt als Katheterurin oder als Spontanurin von Patienten in Mengen von 0,5 bis 50 L gewonnen und zur Vermeidung der Proteolyse sofort mit verdünnter Säure (z.B. 1 M HCl) auf einen pH-Wert zwischen 2.0 und 4.0 eingestellt und auf 4° C gekühlt. Nach einer Ultrafiltration über eine Cellulose-Triacetat Membran mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa (Sartocon-Mini Apparatur, Sartorius) wird das Filtrat als Quelle von Peptiden im weiteren verwendet.

#### 2. Gewinnung der Urin-Peptide und Auftrennung in Fraktionen

##### 2.1 Peptidextraktion mit stufenweiser Elution

10 L Urin-Filtrat werden mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 6 mS/cm verdünnt und der pH mit HCl auf 2.7 eingestellt. Das Urin-Filtrat wird dann auf eine Chromatographiesäule aufgetragen. Nach Bindung der Peptide werden die gebundenen Peptide mit einem Kochsalzgradienten eluiert.

##### *Chromatographiebedingungen:*

Fluß beim Auftrag: 100 ml/min

Fluß beim Eluieren: 30 ml/min

Detektion: 214 nm

Säule: Vantage (Amicon, Witten) 6 cm Durchmesser x 7 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Merck Fraktogel TSK SP 650 M

Anlage: BioCAD 250, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer A: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 3.0

Puffer B: 1,5 M NaCl in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 2000 ml

13.08.96

Das Eluat wird in 10 Pools à 200 ml gesammelt

## 2.2 Zweite chromatographische Auftrennung

Die Fraktionen werden separat über eine Reverse-Phase-Säule chromatographiert.

### *Chromatographiebedingungen:*

Fluß beim Auftrag: 10 ml/min

Fluß beim Eluieren: 4 ml/min

Detektion: 214 nm

Säule: HPLC-Stahlsäule, 1 cm Durchmesser, 12.5 cm Füllhöhe

Säulenmaterial: Pharmacia Source RPC 15 µm

Anlage: BioCAD, Perseptive Biosystems, Wiesbaden-Nordenstadt

Puffer A: 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser

Puffer B: 80% Acetonitril in A

Gradient: 0% B auf 100% B in 200 ml

Das Eluat wird in 4 ml-Fraktionen gesammelt

Der weitere Verlauf der Charakterisierung entspricht Beispiel 1.

## Patentansprüche

Dieses Verfahren ist einsetzbar

1. Verfahren zur Herstellung von Peptidfraktionen aus Körperflüssigkeiten, Geweben und Zellüberständen beruhend auf Ultrafiltration, Ionenaustauscherextraktion, pH-Elution, Reverse-Phase Trennung und Gefriertrocknung.

2. Anwendung des Verfahrens nach 1 zur Kartierung von Peptiden aus Körperflüssigkeiten und Geweben

3. Anwendung des Verfahrens nach 1 zur Herstenllung von Proben für die Chromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung zur vergleichenden Betrachtung des Peptidspektrums aus Körperflüssigkeiten und Geweben

13.08.96

4. Anwendung des Verfahrens nach 1 und 3 zur Identifikation von Peptidmarkern
5. Anwendung des Verfahrens nach 1 zur Aufreinigung von durch die Kartierung definierten Peptiden
6. Anwendung des Verfahrens nach 1 und 3 zum Einsatz in der Diagnostik von Erkrankungen, die definierte Änderungen im Peptidspektrum von Körperflüssigkeiten und Geweben verursachen, insbesondere Tumorerkrankungen, Systemerkrankungen, Erkrankungen des Bewegungsapparates wie Osteoporose, des Herz-Kreislaufsystems, des Immunsystems etc.
7. Anwendung des Verfahrens nach 1 zur Entwicklung von Nachweisverfahren für Peptide wie ELISA, RIA, LC-MS-Messung

Hannover, 13.08.1996

Dr.med. Peter Schulz-Knappe    Prof.Dr.med. Wolf-Georg Forssmann

Dr.rer.nat. Hans-Georg Opitz

THIS PAGE BLANK (USPTO)